

UNIVERSITE DE GENEVE
Département des spécialités médicales
Clinique de dermatologie et de vénéréologie

FACULTE DE MEDECINE
Professeur Paul LAUGIER

**ETUDES COMPARATIVES
DE DEUX SUBSTANCES PHOTSENSIBILISANTES
SUR DES CULTURES DE FIBROBLASTES :
EFFETS DE L'HEMATOPORPHYRINE ET DU PSORALENE
SUR L'INCORPORATION DE LA THYMIDINE**

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Charles Kabangu NTUITE

du

Zaïre

Thèse No 3644

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545901_0042

UNIVERSITE DE GENEVE
Département des spécialités médicales
Clinique de dermatologie et de vénéréologie

FACULTE DE MEDECINE
Professeur Paul LAUGIER

**ETUDES COMPARATIVES
DE DEUX SUBSTANCES PHOTOSENSIBILISANTES
SUR DES CULTURES DE FIBROBLASTES :
EFFETS DE L'HEMATOPORPHYRINE ET DU PSORALENE
SUR L'INCORPORATION DE LA THYMIDINE**

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Charles Kabangu NTUITE

du

Zaïre

Thèse No 3644

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1978

La Faculté de médecine, sur le préavis du professeur Paul Laugier, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 21 décembre 1977

Le doyen :
Marcel Jenny

Thèse No 3644



Je tiens à exprimer aux professeurs P. Laugier, directeur de la Clinique de dermatologie universitaire de Genève, et R. Weil, du Département de biologie moléculaire, Université de Genève, ma plus profonde reconnaissance pour leur aide, sans laquelle ce travail n'eût pas pu être réalisé.

Je remercie également le docteur L. Olmos qui a bien voulu diriger ce travail.

Cette étude a été rendue possible grâce à l'aide et conseils du docteur H. Turler, Messieurs I. Marcovitch et N. Bensemmane. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance.

A MES PARENTS

A MA FEMME

A MES AMIS

TABLE DE MATIERES

I.	Introduction	5
II.	Matériel et Méthodes	6
	1) Préparation des cellules souches	6
	2) Culture des cellules	6
	3) L'expérimentation.	7
	a) Les agents	7
	b) L'irradiation	7
	c) L'incorporation de la thymidine	7
	d) Lavage des cellules	7
	4) Examens des échantillons	10
	a) Comptage de la radioactivité	10
	b) Les autoradiographies	10
	c) Signification des résultats	10
	d) Expression des résultats	10
III.	Résultats	11
	1) L'effet de l'irradiation	11
	2) L'effet de l'hématoporphyrine	11
	3) L'effet du psoralène	11
	4) L'effet de l'hématoporphyrine et du psoralène	12
IV.	Discussion	13
V.	Conclusion	14
	Tableau	15-16
	Légende	17
	Bibliographie	18

INTRODUCTION

Depuis l'antiquité, on sait que la lumière solaire peut provoquer des effets nocifs sur la peau humaine. Les exemples les plus connus sont l'élastose sénile et la dégénérescence dermique de la peau des marins et des paysans soumis à l'exposition solaire chronique (1, 2, 3). Certaines substances connues depuis l'antiquité, sensibilisent la peau à la lumière même. En 1916 Freund constata des réactions phototoxiques dues à l'application d'eau de cologne et suggéra la présence de substances photosensibilisantes contenues dans l'huile de bergamote (4), qui se sont révélées par la suite être des furocoumarines (5). En 1959, Griffin et col. attribuèrent au 8-méthoxypsoralène, qui a été utilisé dans la thérapie du vitiligo, la propriété de réhausser la photocarcinogénèse lorsqu'il est appliqué localement (6, 8).

Cette substance, un dérivé du psoralène, appartient au groupe des furocoumarines, qui forment la catégorie des photosensibilisants exogènes (6, 9). Par ailleurs, à la fin du 19^{ème} et au début du 20^{ème} siècle Anderson, Hausmann et Günther constatèrent chez les patients atteints de porphyrie, une très grande sensibilité à la lumière (10-12). Meyer-Betz s'était sensibilisé lui-même à la lumière par injection intraveineuse d'hématoporphyrine (13). Comme l'hématoporphyrine, d'autres photosensibilisants telles que les catalases, les cytochromes et les peroxydes, constituent la catégorie des photosensibilisants endogènes (9).

Cliniquement ces 2 groupes de substances produisent le même type de lésions. Une injection intradermique d'une de ces substances, provoque dermatites, érythèmes, oedèmes, vésicules et pigmentation (14-16). Cependant, concernant leur mode d'action, il semble qu'il y ait des différences entre, en particulier, le psoralène et l'hématoporphyrine. Ainsi, contrairement au psoralène, l'hématoporphyrine a besoin d'oxygène pour produire son effet (5). De plus en ce qui concerne le psoralène le lieu d'action semble être au niveau du DNA (17-36). Par contre, concernant l'hématoporphyrine, les études pour élucider son mode d'action, semblent être inspirées uniquement par son effet hémolytique (37, 38). C'est ainsi qu'Allison et col. ont rapporté des lésions des membranes de la cellule et des lysosomes (37). A notre connaissance, un effet éventuel de l'hématoporphyrine sur la synthèse du DNA n'a pas été envisagé et aucune étude comparative entre le psoralène et l'hématoporphyrine n'a été rapportée.

Dans la présente étude, nous nous proposons donc d'essayer de combler cette lacune en comparant les effets du psoralène et de l'hématoporphyrine sur la synthèse du DNA, sur une préparation des cultures des fibroblastes provenant des peaux d'embryons de souris.

MATERIEL ET METHODES

Les fibroblastes utilisés sont obtenus à partir des fragments de peau provenant d'embryons de souris albinos de 17 à 21 jours de gestation. La femelle portante est sacrifiée par narcose au chloroforme, les poils de l'abdomen rasés, la peau désinfectée et la paroi abdominale incisée (39). L'utérus prélevé est déposé dans une boîte de Pétri contenant une solution de "TD" stérile (tampon Tris salin, enrichi de streptomycine et de pénicilline). Les embryons sont retirés et débarassés de leur membrane amniotique. Ils sont alors lavés deux fois avec la solution "TD" dans des conditions stériles. La quasi totalité de la peau d'embryons est prélevée, excisée et finement hachée avec des ciseaux. Le broyat est lavé deux fois dans une solution de "TD" puis centrifugé (MCE multex centrifuge) pendant 4 minutes à 350 x g.

1) Préparation des cellules souches.

Le matériel est ensuite transféré dans 20 ml. de solution de "TD" contenant 2 g/1000 ml. de Trypsine-EDTA (Difco, Detroit Michigan, USA). La trypsinisation du broyat est accélérée par une agitation continue d'une durée de 15 minutes. Après l'arrêt de l'agitation, la suspension cellulaire sédimente 2 à 3 minutes. Le surnageant qui contient des cellules isolées, est prélevé et mis dans 10 ml. de milieu de "Eagle" (40-41). On ajoute du sérum de veau (10g/10 ml.) (Sibco, Grand Island Biological Company, New York) pour arrêter la trypsinisation (42). Le sédiment restant est soumis de nouveau à une trypsinisation. Cette opération peut être répétée jusqu'à 3 fois. La suspension cellulaire dans le milieu contenant du sérum de veau est centrifugée pendant 4 minutes à 350 x g. Le culot resuspendu dans 10 ml. de milieu de culture (Eagle) enrichi de sérum de veau est passé à travers une gaze stérile pour le débarasser des gros éléments. Le volume de la suspension de cellules est porté à 100 ml. en ajoutant du milieu "Eagle". On peut ensemenecer ainsi une dizaine de boîtes de Pétri (9 cm de diamètre) qui reçoivent chacune 10 ml. de matériel à cultiver.

2) Culture des cellules.

Les boîtes sont mises à l'incubateur (Secfroid national Weinicke Company) à 37° C, gazé avec mélange de 5 % Co₂ et 95 % d'air. Environ 24 heures après l'ensemencement, les fibroblastes font leur apparition et les cellules épithéliales disparaissent. Après 3 jours environ, les cellules deviennent confluentes (couvrant 80 à 90 % de la surface). Ces cultures primaires sont ensuite utilisées pour obtenir des cultures secondaires. Aux cellules débarassées du milieu usé, on ajoute 5 ml. de solution "Trypsine-EDTA" par boîte. Puis, on les incube pendant 5 minutes à 37° C. La suspension cellulaire obtenue après trypsinisation est centrifugée à 350 x g pendant 4 minutes. Le surnageant est jeté. Le culot est resuspendu dans 100 ml. de milieu de culture, enrichi de

sérum de veau à 10 % et les cellules comptées (300'000-600'000/ml). On en sème avec 4 ml. de cette suspension des petites boîtes de Pétri (35 mm de diamètre) au fond desquelles est déposée une petite lamelle. Les cellules croissent sur la lamelle et après 2 jours environ, les cultures confluent à 80-90 % et sont utilisées pour l'expérience (30, 43-46).

3) L'expérimentation.

a) Les agents.

Comme il est indiqué dans le tableau I, les boîtes de Pétri sont réparties en 5 groupes. Le groupe A reçoit 0,2 ml d'une solution contenant de l'hématoporphyrine (2 mg/100 ml). Le groupe B reçoit 0,2 ml. d'une solution du psoralène contenant 1 mg/100 ml. Le groupe C reçoit 0,2 ml. de la solution d'hématoporphyrine et 0,2 ml. de la solution du psoralène. Le groupe D comme tous les autres groupes précités sera uniquement irradié. Le groupe E est le groupe témoin.

b) L'irradiation.

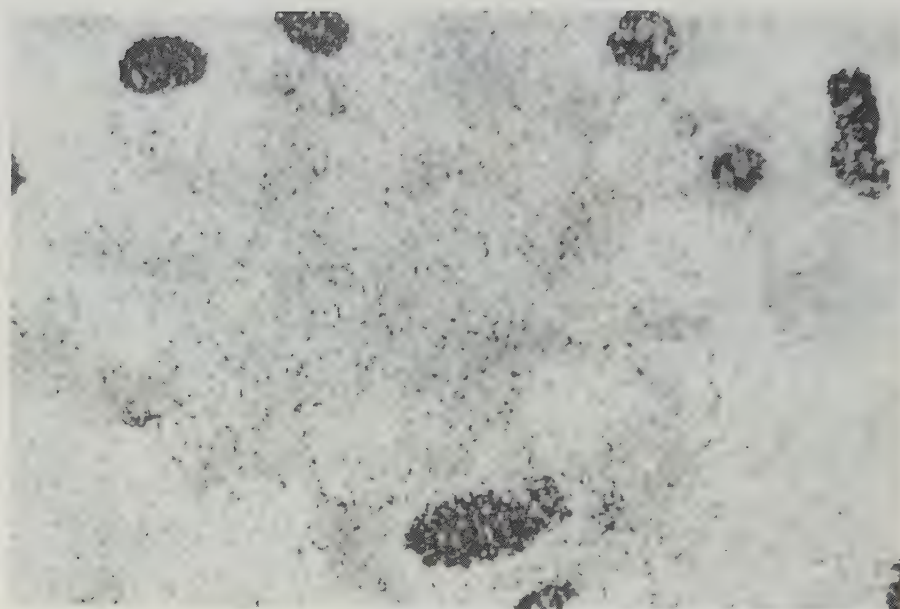
A la fin d'une période d'incubation d'une heure, les cellules à l'exception de celles du groupe témoin E sont irradiées, selon le procédé décrit par Walter et Fritsch (30, 47). Les boîtes, couvertes d'un verre d'une épaisseur de 3 mm, sont exposées à la lumière noire à une distance de 15 cm (tube Philips de lumière noire 40 W / 08 RS UV). L'énergie de la lumière ultra-violette est estimée à 1.300 microWatts/cm³ par radiomètre (black ray violet meter, ultra products, Inc, San Gabriel, California, USA). Le spectre d'action est de l'ordre de 320-400nm, avec l'optimum se situant à 360 nm. La température est maintenue à 37° C.

c) L'incorporation de la thymidine.

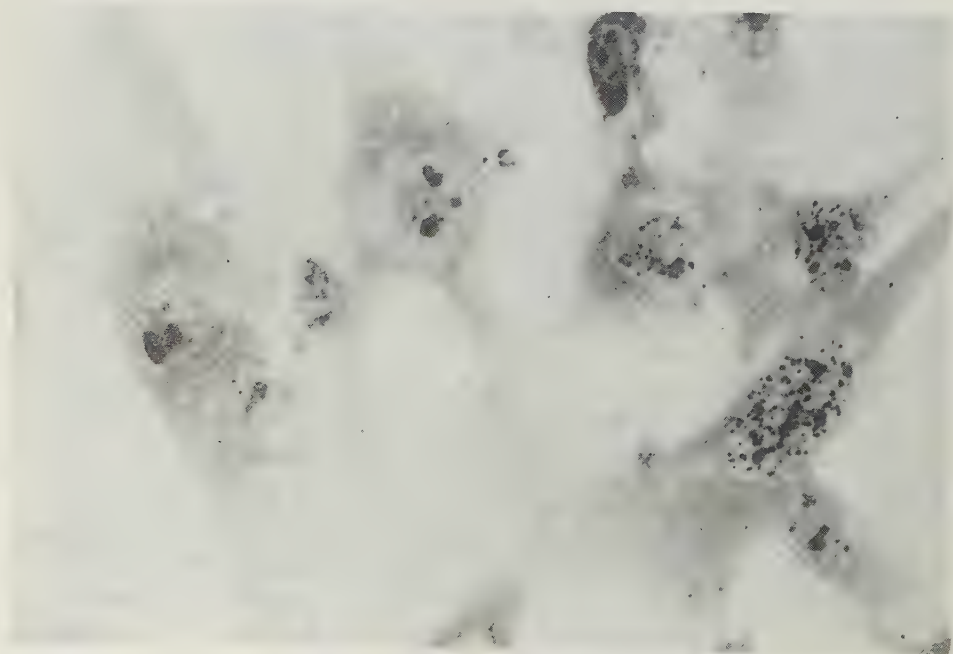
Après l'irradiation, les boîtes sont de nouveau remises à l'incubateur pour une période d'une heure. Elles reçoivent ensuite 2 ml. d'une solution contenant 1 microcurie/ml. de thymidine tritiée (activité spécifique 20 Ci/mM). Les boîtes séjournent à l'incubateur pendant 24 heures. L'incorporation de la thymidine dans le DNA n'a lieu que pendant la phase S où se déroule la synthèse du DNA. La durée de la phase S pour les tissus des rongeurs est de 6 à 8 heures d'après Baserga (48).

d) Lavage des cellules.

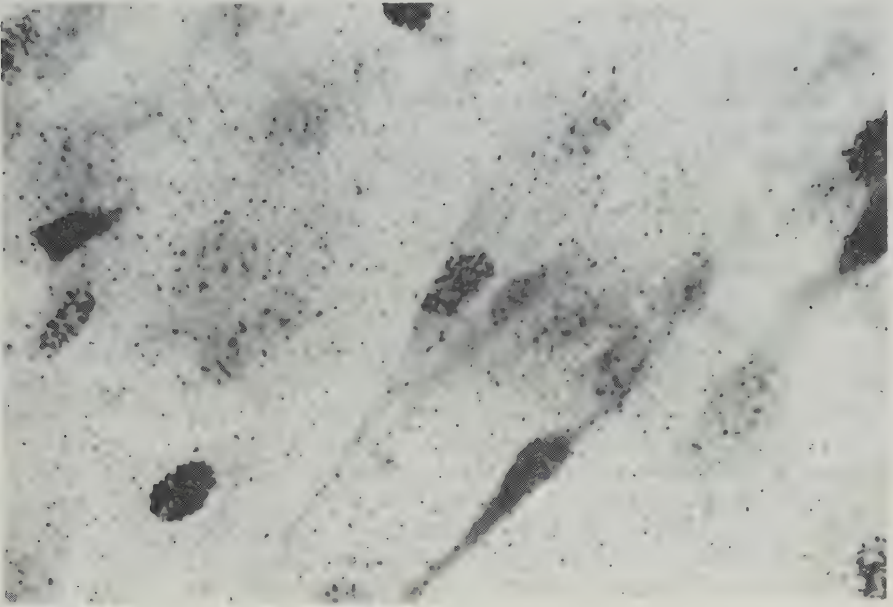
A la fin de cette période d'incubation de 24 heures en présence de thymidine marquée, les cultures sont débarassées du milieu radioactif. Elles sont lavées 3 fois avec 2 ml. d'une solution de "TD" à 37° C, puis séchées à l'air en soulevant la lamelle avec une aiguille. 2 ml. de milieu de culture sans sérum sont ajoutés par boîte et les boîtes de nouveau remises à l'incubateur pendant 60 minutes. Les lamelles sont débarassées du milieu de culture, lavées de nouveau 5 fois avec 2 ml. d'une solution de "PBS" (Merck, Darmstadt, RDA).



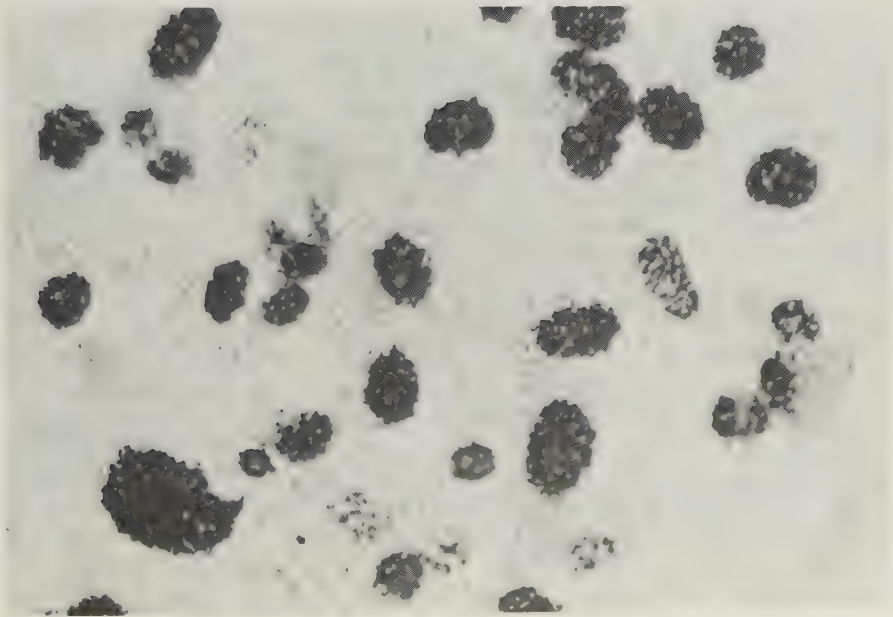
a) d'hématoporphyrine



b) du psoralène



c) d'hématoporphyrine et psoralène



d) comparons les cellules uniquement irradiées
(groupe D) et celles du groupe témoin E

4) Examens des échantillons.

a) Comptage de la radioactivité.

Les cellules fixées avec un mélange d'éthanol et d'acide acétique glacial à raison de 3 : 1 (V/V) pendant 10 minutes à la température ambiante sont séchées à l'air. Chaque lamelle est coupée en deux parties à l'aide d'un diamant. Les deux parties sont introduites dans un même tube contenant du liquide à scintillation (PPO/POPO) (Packard instrument international, Merck respectivement) et leur radioactivité comptée dans un spectromètre à scintillation liquide (modèle Isocap 300 Nucléar Chicago, USA, 60 % d'efficacité).

b) Les autoradiographies.

Le comptage fini, les lamelles sont lavées avec une solution de Tolud, séchées à l'air, collées sur une grande lame puis encore séchées pendant plusieurs heures. Elles sont passées dans une émulsion (Kodak NTB 2) à la température ambiante (20-21° C) et conservées à 4° C pendant environ 10 jours, ensuite fixées, pendant 5 minutes dans une solution de F A 55 D 19 (Kodak), diluée dans de l'eau distillée. Toutes ces manipulations se font dans une chambre noire. La suite des manipulations s'effectue à la lumière ordinaire. Les lames sont rincées sous l'eau courante pendant 20 minutes, puis séchées à l'air. On colore les lames en les passant pendant 10 minutes dans une solution de "Giemsa" diluée 20 fois, ensuite elles sont rincées sous l'eau courante (46). L'examen des autoradiographies est objectivé par l'indice de marquage qui est égal au nombre de cellules ayant au moins 15 grains par noyau, dans une population de 500 cellules.

c) Signification des résultats.

Le cycle des cellules en culture est de 12 à 48 heures d'après Baserga (48). Pendant l'incubation de 24 heures en présence de thymidine marquée, la grande majorité des cellules susceptibles de se diviser a pu incorporer la thymidine radioactive. Ce qui donne une mesure de capacité de l'ensemble de cellules de synthétiser le DNA. Seules les cellules qui sont en phase S au moment de marquage, auront pu incorporer la thymidine marquée. L'indice de marquage, lui, est l'expression du nombre de cellules qui se trouvent dans la phase S, c'est-à-dire de cellules qui sont en train de synthétiser le DNA durant cette période d'incubation.

d) Expression des résultats.

Ce sont les fibroblastes du groupe témoin (E) qui incorporent le mieux la thymidine. Aussi dans l'expression des résultats, le groupe témoin (E) est pris comme référence. Son contenu cellulaire en radioactivité (CPM = comptés par minute) et son indice de marquage en autoradiographie sont considérés comme équivalents à 100 %. Les résultats sont analysés en utilisant le test de t "Student" pour des valeurs paires.

RESULTATS

1) L'effet de l'irradiation.

Dans les expériences préliminaires, nous avons pu constater que les fibroblastes irradiés pendant 1 ou 2 heures sont endommagés à tel point qu'ils n'incorporent quasiment plus de thymidine. Par contre, lorsqu'ils sont soumis à une irradiation de courte durée (2', 5' ou 8'), ces cellules incorporent la thymidine d'une manière similaire aux cellules non irradiées.

En effet, la différence dans les coups par minute mesurés par la spectrométrie entre le groupe de cellules témoin (E) et le groupe de cellules ainsi irradiées (groupe D) est inférieure à 4 % de la valeur moyenne du groupe témoin et n'est pas significative ($P > 0,20$) (Tableau II). De même l'indice de marquage du groupe de cellules uniquement irradiées (D) est très voisin de celui du groupe témoin (E) (Tableau II). La différence est de 1 % et n'est pas significative ($P > 0,40$). Cependant, en présence de substances photosensibilisantes dans le milieu d'incubation, cette irradiation de courte durée, altère l'incorporation de la thymidine.

2) L'effet de l'hématoporphyrine.

En présence de l'hématoporphyrine, dans le milieu d'incubation, l'incorporation de la thymidine par les cellules irradiées pendant une courte durée, est nettement inhibée. La différence entre le groupe de cellules qui ont reçu en plus l'hématoporphyrine et le groupe des cellules uniquement irradiées (groupe D), représente 30,45 % de la valeur moyenne du groupe D lorsque l'on considère les résultats de la spectrométrie ou 40,5 % lorsque l'on considère l'indice de marquage.

Ces différences sont nettement significative ($P < 0,01$; $P < 0,0005$ respectivement).

3) L'effet du psoralène.

En présence du psoralène dans le milieu d'incubation, l'incorporation de la thymidine dans les cellules irradiées pendant une courte durée, est nettement inhibée. La différence entre le groupe de cellules uniquement irradiées (groupe D), et le groupe de cellules qui ont reçu en plus le psoralène (groupe B), représente 31,65 % de la valeur moyenne du groupe D lorsque l'on considère les coups par minute et 40,83 % lorsque l'on considère l'indice de marquage. Ces différences sont nettement significative ($P < 0,0125$; $P < 0,0005$; respectivement).

4) L'effet de l'hématoporphyrine et du psoralène.

L'effet conjugué de l'hématoporphyrine et du psoralène sur les cellules irradiées, produit une inhibition sur l'incorporation de la thymidine avec le groupe de cellules uniquement irradiées (groupe D). La différence représente 42,12 % de la valeur moyenne de ce groupe (D) en CPM et 49,17 % en indice de marquage. Ces différences sont nettement significatives ($P < 0,025$; $P < 0,0005$ respectivement). De plus, l'effet conjugué de l'hématoporphyrine et du psoralène est plus important que l'effet de l'hématoporphyrine seule (groupe A) ou du psoralène seul (groupe B) lorsque l'on considère les CPM mesurés par la spectrométrie. La différence entre le groupe de cellules qui ont reçu l'hématoporphyrine seule (groupe A) et le groupe de cellules qui ont reçu l'hématoporphyrine et le psoralène (groupe C), représente 16,77 % de la valeur moyenne du groupe A et est nettement significative ($P < 0,025$). De même la différence entre le groupe de cellules qui ont reçu de l'hématoporphyrine et le psoralène (groupe C) et le groupe de cellules qui ont reçu le psoralène seul (groupe B), représente 15,32 % de la valeur moyenne du groupe B et est nettement significative ($P < 0,01$).

Cependant, lorsque l'on considère l'indice de marquage, si l'effet conjugué de l'hématoporphyrine et du psoralène (groupe C) paraît plus important que l'effet de l'hématoporphyrine seule (groupe A) ou du psoralène seul (groupe B), la différence n'est pas significative ($P > 0,05$; $P > 0,05$; respectivement).

DISCUSSION

Cette étude montre 1) que les fibroblastes soumis à une irradiation de longue durée (1 ou 2 heures) sont très fortement endommagés ; 2) que des cellules soumises à une irradiation de courte durée ne sont pas affectées. 3) L'hématoporphyrine et le psoralène inhibent d'une manière similaire la synthèse du DNA. 4) L'effet conjugué de l'hématoporphyrine et du psoralène sur la synthèse du DNA est plus important que celui de chacune de ces substances isolément, sans cependant qu'il y ait à proprement parler une potentialisation.

Depuis le début du siècle, l'effet des radiations sur les systèmes vivants a été étudié à différents niveaux : sur des organismes entiers, unicellulaires ou pluricellulaires ; sur des organes ou tissus, sur des cellules entières aussi bien que des structures subcellulaires (49-52, 73). Les résultats de nombreuses études sur une grande variété des systèmes indiquent une relation quantitative entre le contenu en DNA et la sensibilité aux radiations, chez des virus, des bactéries et des cellules de mammifères aussi bien que des plantes (55-63, 73). Il n'y a pas de théorie satisfaisante sur l'action de l'irradiation. Les idées proposées sont nombreuses et très souvent contradictoires. Néanmoins, il est généralement admis que les effets principaux de l'irradiation sont, de quelque manière que ce soit, produits à travers le DNA. Les radiations peuvent produire dans le DNA des lésions chimiques (53-71) qui peuvent bloquer la mitose et provoquer la mort des systèmes. Le mécanisme primaire et responsable de la mort cellulaire produite par l'irradiation reste inconnu. Cependant, on admet généralement que les effets directs de l'irradiation sur la structure et le métabolisme du DNA représente la lésion qui précède une série d'évènements moléculaires qui conduisent à la mort des organismes.

Dans nos propres expériences, les cellules soumises à l'irradiation de longue durée (1 à 2 heures) sont fortement endommagées. Au microscope, nous avons pu observer une dégénérescence du cytoplasme aussi bien que du noyau ; formations des vacuoles au niveau du cytoplasme et pycnose du noyau. Ces cellules sont incapables d'incorporer la thymidine. Mais une irradiation de courte durée (n'excédant pas 8 minutes) n'a pas d'effet nocif sur les cellules. Au microscope, nous ne décelons aucune anomalie. L'incorporation de la thymidine est similaire à celle des cellules qui n'ont pas été irradiées (groupe témoin E). Ceci lorsque l'on considère le contenu en radioactivité mesurée au spectromètre à scintillation liquide ou bien l'indice de marquage des autoradiographies.

Cependant, en présence des substances photosensibilisantes, cette irradiation de courte durée est capable d'affecter les cellules. Nous savons par ailleurs que ces substances photosensibilisantes sont capables, sous l'action de la lumière, de tuer les bactéries, les champignons et divers parasites (6-8, 20, 72). Se pose la question de savoir comment ces substances produisent leurs ef-

fets toxiques sur les organismes vivants. Dans la littérature, on distingue 2 modes d'action de substances photosensibilisantes. Pour les furocoumarines (psoralènes), il semble que c'est d'abord la synthèse du DNA qui est affectée par une réaction photochimique entre le DNA et par exemple le psoralène. Sans irradiation, le psoralène forme un complexe lâche, faiblement lié au DNA (22, 25, 26, 28, 30). Sous l'effet de l'irradiation (environ 365 nm), une réaction photochimique se produit avec formation d'une liaison covalente stable entre le psoralène et les bases pyrimidines de l'acide nucléique (23, 25, 28, 30, 36) ; ce qui bloque la réplication du DNA. En ce qui concerne les autres substances photosensibilisantes, en particulier, l'hématoporphyrine, le mode d'action n'est pas encore clairement élucidé. Selon Allison, cette substance altère les membranes de la cellule et des lysosomes. Cependant, nos propres expériences montrent que l'hématoporphyrine, comme le psoralène, produit une inhibition de la synthèse du DNA.

En conclusion, nous avons vu plus haut que l'effet de la lumière est d'altérer d'une façon ou d'une autre le DNA cellulaire. Les photosensibilisants, comme leur nom l'indique, sensibilisent à la lumière, en l'occurrence sur le DNA, qui préside à la synthèse des protéines. On peut donc s'attendre à ce que toute perturbation du DNA produise à plus ou moins long terme une altération dans la synthèse des protéines, protéines qui jouent un rôle fondamental dans les structures et fonctions de la cellule. Cependant, il reste possible qu'une altération des structures cellulaires produise une perturbation dans les fonctions de la cellule pouvant se répercuter sur la synthèse du DNA. Nous avons pu montrer que l'hématoporphyrine, à côté de ses effets sur les membranes (37) rapportés dans la littérature, produit aussi une altération dans la synthèse du DNA. Cependant, en ce qui concerne le psoralène à notre connaissance, ses effets éventuels sur les autres fonctions et structures cellulaires, n'ont pas été étudiés. Il semble donc que l'action de ces 2 substances, peut ne pas être aussi univoque qu'elle n'apparaît à travers la littérature, ou bien uniquement sur les membranes ou bien uniquement sur le DNA. Elle pourrait être d'une nature plus complexe qui mérite des études plus approfondies.

TABLEAU I

	A	B	C	D	E
HP	+	-	+	-	-
PS	-	+	+	-	-
Irr.	+	+	+	+	-
Thy	+	+	+	+	+

HP : hématoporphyrine ; PS : psoralène ; Thy : thymidine tritiée.

Le signe (+) indique que le groupe a reçu la substance correspondante ou a été irradié.

Le signe (-) indique que le groupe n'a pas été traité avec la substance correspondante.

TABLEAU II

Effet de l'hématoporphyrine et du psoralène sur la synthèse du DNA par les fibroblastes : Mesures spectrométriques (CPM = comptes par minute) et indice de marquage en autoradiographie.

	comparaison entre les groupes	nombre des échant. 6	Différence (% des contrôles ; E = 100 %)	P
CPM	E-A		32,93	$P < 0,005$
	E-B		34,08	$P < 0,025$
	E-C		44,18	$P < 0,0025$
	E-D		3,56	$P > 0,20$
	A-B		1,71	$P > 0,40$
	A-C		16,77	$P < 0,025$
	D-A		30,45	$P < 0,01$
	D-B		31,64	$P < 0,0125$
	D-C		42,11	$P < 0,0025$
	B-C		15,32	$P < 0,01$
Autoradio- graphies	E-A		39,5	$P < 0,0005$
	E-B		39,83	$P < 0,0005$
	E-C		48,67	$P < 0,0005$
	E-D		-1	$P > 0,40$
	D-A		40,09	$P < 0,0005$
	D-B		40,42	$P < 0,0005$
	D-C		49,17	$P < 0,0005$
	A-B		0,54	$P > 0,40$
	A-C		15,09	$P > 0,05$
	B-C		14,69	$P > 0,05$

LEGENDES

Autoradiographies des fibroblastes d'embryons de souris après incubation pendant 60 minutes en présence de thymidine tritiée.

Les cellules ont été préalablement traitées comme il est indiqué dans le tableau I. Irradiation (8 minutes), après préincubation pendant une heure en présence :

- a) d'hématoporphyrine
- b) du psoralène
- c) d'hématoporphyrine et psoralène
- d) comparon les cellules uniquement irradiées (groupe D) et celles du groupe témoin E : le comportement de ces cellules est sensiblement identique.

Notons la faible densité de marquage et une tendance à l'acellularité chez les cultures traitées aux photosensibilisants. G X 400.

BIBLIOGRAPHIE

1. URBACH L., FORBES P.D., DAVIES R.E., BERGER D. :
Cutaneous photobiology : past, present and future. *Journal of Invest. derm.*, 67 (209-224), 1976.
2. UNNA P. : *Histopathologie der Hautkrankheiten*, Berlin, August Hirschwald, 1894.
3. DUBREUILH W. : Des hyperkeratoses circonscrites. *Ann. derm. Syph.* (Ser 3) 7 (1158-1204) 1896.
4. FREUND E. : Ueber bisher noch nicht beschriebene künstliche Hautfärbungen. *Derm. Wochenschr.* 63 (931), 1961.
5. MUSAJO L. and RODIGHIERO G. : the skin photosensitizing furocoumarine. *Exp.* 18 (153) 1962.
6. FOWLKS W.L., GRIFFITH D.G. and OGINSKY E.L. : Photosensitization of bacteria by furocoumarins and related compounds. *Nature* 181 (571), 1958.
7. MUSAJO L., RODIGHIERO G., COLOMBIO G., TORLONE V. and DALL'ACQUA F. : Photosensitizing furocoumarins : Interaction with DNA and photo Inactivation of DNA containing virusses. *Exp.* 21 (22), 1965.
8. PATHAK M.A., KRAEMER D.M. and FITZPATRIK T.B. : Photobiology and photochemistry of furocoumarins (psoralens) : In *Sunlight and man* University press of Tokyo, Tokyo 1974.
9. MATTHEWS M.M. : Effect of beta-carotene against lethal photosensitization by hematoporphyrin. *Natur* : 203 (1092) 1964.
10. ANDERSON T. Mc : Hydroa vacciniforme : *Br.J. dermatol.* 10 (1-4) 1898.
11. HAUSMANN W. : Ueber die Sensibilisierende Wirkung tierischer Farbstoffe und ihre physiologische Bedeutung : *Biochem. Z.* 14 (275-278), 1908.
12. GUENTHER H. : Die Haematoporphyrin : *Dtsch. Arch. Klin. Med.* : 105 (89-146), 1912.
13. MEYER-BETZ F. : Untersuchungen über die biologische photochemische Wirkung des Haematoporphyrins und anderer Derivate des Blut und Gallenfarbstoffes. *Dtsch Arch. Klin. Med.* 112 (476-503), 1913.
14. FITZPATRICK T.B., HOPKINS C.E., DELBERT D., BLICKENSTAFF M.S., SWIFT S. : Augmented pigmentation and other responses of normal human skin to solar radiation following oral administration of 8-methoxy-psoralen : *J. Invest. derm.* 25 (187), 1955.

15. MUSAJO L. : Interessante proprieta della furocoumarine naturali : *Il Farmaco*, Ed. Sci., 10 (2) 1955.
16. MUSAJO L., RODIGHIERO G., CAPORALE G. and ANTONELLO C. : Ulteriori ricerche sui rapporti fra costituzione e proprieta fotodinamiche nel campo delle furocoumarine : *Il Farmaco Ed.Sci.*, 13 (355), 1958.
17. KRAEMER D.M.: Photoreaction of psoralen with uracil or thymine as well as with their nucleosides and nucleotides : Dissertation : Naturwissenschaftliche Fakultät der Johann Wolfgang Univ. Frankfurt 1966.
18. KRAUCH C.H., KRAMER D.M., and WACKER A. : Photoreaction of psoralen with uracil or thymine as well as with their nucleosides and nucleotides : *Photochem. Photobiol.* 6 (341), 1967.
19. MUSAJO J., RODIGHIERO, BRECCIA A., DALL'ACQUA F. and MALESANI G. : Skin-photosensitizing furocoumarins : photochemical interaction between DNA and 0 14 CH₃ bergapten (5-methoxy-psoralen) : 5 (739-745), 1966.
20. MUSAJO L., VISENTINI P., BACCICHETTI F. and RAZZI M.A. : Photoinactivation of Ehrlich Ascites tumor cells in vitro obtained with skin-photosensitizing furocoumarins : *Exp.* 23 (335), 1967.
21. MUSAJO L., BORDIN F., CAPORALE G., MARCIANI S., RIGATTI G. : Photoreactions at 3655 Å between pyrimidine bases and bases skin-photosensitizing furocoumarins. *Photochem. Photobiol.* 6 (711), 1967.
22. PATHAK M.A., WORDEN L.R. and KAUFMAN K.D. : Effect of structural alterations on the photosensitizing potency of furocoumarins (psoralens) and related compounds. *J. Invest. derm.* 48 (103-118), 1967.
23. PATHAK M.A., KRAMER D.M. : Photosensitization of skin in vivo by furocoumarins (psoralens). *Biochim. Biophys. Acta*, 195, (197-206), 1969.
24. COLE, RONALD S. : Light induced cross linking of DNA in the presence of a furocoumarin (psoralen). Studies with phage escherichia coli, and mouse leukemia cells. *Biochim. et Biophys. Acta*, 217 (30-39), 1970.
25. MUSAJO L., RODIGHIERO G. : Studies on the photo-C₄-cyclo-addition reactions between skin photosensitizing furocoumarins and nucleic acids. *Photochem. Photobiol.* 11 (27-35), 1970.
26. RODIGHIERO G. et al : Mechanism of skin photosensitization by furocoumarins with native DNA and with ribosomal RNA. *Biochim. Biophys. Acta* 217 (40-49), 1970.
27. SONG P.S., HARTER M.L., MOON T.A. and HERNDON W.C. : Studies on excited states of psoralens. *Photochem. Photobiol.* 14 (521), 1971.
28. DALL'ACQUA F., MARCIANI S., CIAVATTA L. et al : Formation of interstrand cross-linkings in the photoreactions between furocoumarins and DNA. *Z. Naturforsch. (B)* 26 (561-569), 1971.

29. BADEN H. P., PARRINGTON J. M., DELHAUTY J. D. A. et al. : DNA synthesis in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts following treatment with 8-methoxypsoralen and long wave ultraviolet light. *Biochim. Biophys. Acta* 262 (247-255), 1972.
30. WALTER J. F., VOORHEER J. J., KELSEY W. H., DUELL E. A., A. ARBOR, MICH : Psoralen plus black light inhibits epidermal DNA synthesis : *Arch. dermat.* 107 (861-865), 1973.
31. PARRISH J. A., FITZPATRICK T. B., TANENBAUM L., PATHAK M. A. : Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and long wave ultraviolet light. *New Engl. J. Med.* 291 (1207-1222), 1974.
32. PATHAK M. A., DALL'ACQUA F., RODIGHIERO G. and PARRISH J. A. : Metabolism of psoralens. *J. Invest. dermat.* 62 (347), 1974.
33. CARTER D. M., PAVELEK J. M., CONDIT E. S. and KOCH N. G. : Stimulation of tyrosinase activity by trimethyl-psoralen and ultraviolet in pigment cells. *J. Invest. dermat.* 62 (347), 1974.
34. WOLFF K., FITZPATRICK T. B., PARRISH J. A., GSCHNAIT F., GILCHREST B., HOENIGSMANN H., PATHAK M. A. and TANENBAUM L. : Photochemotherapy for psoriasis with orally administered methoxsalen. *Arch. dermat.* 1976.
35. CHANDRA P., DALL'ACQUA F., MARCIANI S. and RODIGHIERO G. : Studies on the repair of DNA photodamaged by furcoumarins : *Sunlight and Man* (Edited by PATHAK M. A., HARBER L. C., SEIJI M. and KUKITA A.) pp. 411-417. Univ. of Tokyo Press, Tokyo 1974.
36. RODIGHIERO G. and DALL'ACQUA F. : Biochemical and medical aspects of psoralens. *Photochem. Photobiol.* 24 (647), 1976.
37. ALLISON A. C., MAGNUS I. A. and YOUNG M. R. : Role of lysosomes and of cell membranes in photosensitization. *Nature* 209 (874), 1966.
38. HARBER L. C., BAER R. L. and BICKERS D. R. : Fundamental and clinical aspects of the porphyrins : *Sunlight and Man* (Edited by PATHAK M. A., HARBER L. D., SEIJI M. and KUKITA A.) Univ. Press of Tokyo, Tokyo 1974, pp 631-653.
39. FUSENIG N. E. and WORST P. K. M. : Mouse epidermal cell cultures. *Exp. cell Research* 93 (443-457), 1975.
40. EAGLE H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 122 (501-504), 1955.
41. EAGLE H. : Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130 (432-437), 1959.
42. MOSCONA A., TROWELL O. A. and WILLMER E. N. : Cells and tissues in culture : Methods, biology and physiology. Academic Press : London and New York, 1965.
43. PIOUS D. A., HAMBURGER R. N. and MILLS S. E. : Clonal growth of primary human cell cultures. *Experimental cell Research* 33 (495-507), 1964.

44. CRUICKSHANK C.N.D. : Skin in cells and tissues in culture. Academic Press, London and New York, 1965.
45. KRUSE P. F. and PETTESSON M. K. : Human skin fibroblasts in Tissues culture, pp 39-45. Academic Press. London and New York, 1973.
46. PETURSSON G. and WEIL R. : A study on the mechanism of polyoma-induced activation of the cellular DNA-synthesizing apparatus. Arch. gesamte Virusforschung, 24 (1-29), 1968.
47. FRITSCH P., GSCHNAIT F., HOENIGSMANN H. and WOLFF K. : Protective action of beta-carotene against lethal photosensitization of fibroblasts in vitro. British J. of Derm. 94 (263-271), 1976.
48. BASERGA R. : The cell cycle and cancer. Marcel Dekker, Inc., New York 1971.
49. BACQ Z. M., ALEXANDER P. : Fundamental of Radiology. Pergamon Press, Oxford, 1961.
50. ERRERA M., FORSSBERG A., eds : Mechanisms in Radiology. Academic Press, New York, 1961.
51. KUZIN A. M. : "Osnovi radiacio noy Biologii". Nauka, Moscow, 1964.
52. ROMANEV E. F., BLOHINA V. D., KOSCHENKO N. N. and KILIPOVISCH I. V. : Ranii radiacionobiochemiccheskii Reakcii. Amizdat, Moscow, 1966.
53. POLLARD E. C., GUILD W. R., HUTCHINSON and SETLOW R. B. : The direct action of ionizing radiation on enzymes and antigens. Progr. Biophys. 5 (72), 1955.
54. ZIMMER K. Z. : Studies on quantitative radiation Biology. OLIVER P. L. and BOYD, Edinburgh, 1961.
55. SZYBALSKI W. and OPARA-KUBINNSKA Z. : "cellular radiation Biology" WILLIAMS and WILKINS, Baltimore, Maryland, p. 223, 1965.
56. PETTLJOHN D. and HANAWALT P. C. : Evidence for repair-replication of ultraviolet damaged DNA in bacteria.
57. SETLOW R. B. and CARRIER W. L. : Proc. Natl. Acad. Sci U.S. 51 (2937), 1964.
58. BOYCE R. P. and HOWARD-FLANDERS P. : "Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in E. coli K-12". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 51 (293), 1964.
59. MOSELEY B. E. B. and LASER H. : Repair of x-ray damage in Micrococcus radiodurans. Proc. Roy. Soc. B. 162 (210), 1965.
60. HAYNES R. H. : The interpretation of microbial inactivation and recovery phenomena. Radiation Res. Suppl. 6 (1), 1966.
61. Mc GRATH R. A. and Williams R. W. : "Reconstruction in vivo of irradiated Escherichia coli Deoxyribonucleic acid ; the rejoining of broken pieces" Nature 212 (534), 1966.

62. KAPLAN H.S. : DNA-strand scission and loss of viability after x-irradiation of normal and sensitized bacterial cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 55 (1442), 1966.
63. DEAN C.J., FELDSCHEIBER P. and LETT J.T. : Repair of x-ray damage to the deoxyribonucleic acid in micrococcus radiodurans. Nature 209 (49), 1966.
64. LATARJET R., EKERT B., APELGOT S. and REBEYROTTE N. : "Etudes radiobiochimiques sur l'ADN. J. Chim. Phys. 58 (1046), 1961.
65. EKERT B. : Effect of gamma-rays on thymine in De-anated aqueous solutions. Nature 194 (278), 1962.
66. SCHOLLES G. : The radiation chemistry of aqueous solutions of nucleic acids and nucleoproteins. Progr. Biophys. Mol. Biol. 13 (59), 1963.
67. WACKER A. : "molecular mechanism of radiation effects" Progr. in Nucleic acid Res. by Davidson J. N. and Waldo E. E. Cohn. Vol. 1, 1963 pp. 369-416.
68. WEISS J.J. : Chemical effects of ionizing radiations on nucleic acids and related compounds. Progr. in Nucleic acids. Res. by Davidson and Waldo E. Cohn. Vol. 3 pp. 104-142.
69. ORGEL L. E. : "the chemical basis of mutation". Advan. Enzymol. 27 (289), 1965.
70. DEMEREC M. and LATARJET R. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. = (38), 1949.
71. LATARJET R. : Mutation induite chez un virus par irradiation ultra-violette de cellules infectées. Compt. Rend. Acad. Sci. 227 (1354), 1949.
72. TAPEINER H. V. JODBAUER A. : "Die Sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen.
73. KANAZIR D. T. : Radiation-induced alterations in the structure of Deoxyribonucleic acid and biological consequences. Progr. in nucleic acid reserve and molecular biol. by Davidson J. N. and Waldo E. C. Vol. 9.

